Acta Arachnologica, 65(2): 89–95, December 31, 2016

小型カニムシ類の付属肢を用いた迅速・安価な DNA 抽出法

大平　創[1]*・兼子伸吾[2]・塘　忠顕[2]

[1] 〒960–1296 福島県福島市金谷川 1　福島大学大学院共生システム理工学研究科
[2] 〒960–1296 福島県福島市金谷川 1　福島大学理工学群共生システム理工学類
*E-mail: ohira.hajime@gmail.com

A rapid and low-cost protocol for DNA extraction from small-sized pseudoscorpion appendages

Hajime Ohira[1]*, Shingo Kaneko[2], Tadaaki Tsutsumi[2]
[1] *Fukushima University, Graduate School of Symbiotic Systems Science and Technology,*
1 Kanayagawa, Fukushima, Fukushima, 960–1296 Japan
E-mail: ohira.hajime@gmail.com
[2] *Fukushima University, Cluster of Science and Technology, Faculty of Symbiotic Systems Science,*
1 Kanayagawa, Fukushima, Fukushima, 960–1296 Japan
** Corresponding author*

Abstract — DNA from pseudoscorpions for molecular analysis is typically purified using commercial DNA extraction kits. Limitations of these kits include relatively high cost, long examination times, and low DNA yields because of the small body size of pseudoscorpions. Here, we propose a new DNA extraction protocol using isolated single pseudoscorpion appendage. This protocol has several advantages over commercial kits: DNA extraction can be performed rapidly and at a low cost, and the specimens can be used for molecular analysis and then further processed for slide preparation and morphological analysis. In this study, we isolated total genomic DNA from individual pedipalps of two species of small-sized pseudoscorpions belonging to two different suborders, *Mundochthonius japonicus* (Epiocheirata) and *Microbisium pygmaeum* (Iocheirata). The results indicate that this new protocol could be used to determine the partial sequence of the mitochondrial DNA COI region.

Key words — *Microbisium pygmaeum*, mtDNA COI region, *Mundochthonius japonicus*, pseudoscorpion, simple DNA extraction

要　旨 — カニムシ類の付属肢 1 本から DNA を抽出し，証拠標本を保持しつつ，安価・迅速にカニムシ類の DNA 解析を実施する方法を考案した．本方法は，費用や作業時間を大幅に短縮することができ，一般的な DNA 解析用の試薬や機器のみを使用するため，導入も容易である．亜目の異なる 2 種：ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus* とチビコケカニムシ *Microbisium pygmaeum* の片方の触肢から本プロトコルに従い DNA を抽出し，ミトコンドリア DNA の COI 領域を対象に PCR 増幅，塩基配列の決定を行った結果，解析した全ての個体から有効な塩基配列を取得できた．

キーワード — *Microbisium pygmaeum*，ミトコンドリア DNA COI 領域，*Mundochthonius japonicus*，カニムシ，簡易 DNA 抽出

はじめに

カニムシ類（クモ綱：カニムシ目）は陸上の様々な環境に生息する体長 1–8 mm ほどの小型の節足動物である（Weygoldt 1969; Harvey 1990）．カニムシ類はこれまでに 2 亜目 24 科 3400 種以上が記録されており（Harvey 2013），種の記載・分類は実体顕微鏡や生物顕微鏡を使用した外部形態の観察に基づいてなされてきた．ところが，近年のカニムシ類に関する分子系統解析は，形態形質に基づく現在の分類体系は見直しが必要であることを明らかにしつつある（Murienne et al. 2008; Harrison et al. 2014）．また，分子系統解析の結果に基づき，分類群間の診断形質の妥当性についても評価が行われ始めている（Ohira et al. 2016）．しかしながら，データ・バンクに登録されているカニムシ類の塩基配列情報は依然として少なく，GenBank（NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）のデータ・ベースに登録されている塩基配列は 835 件に留まる（2016 年 4 月 18 日最終確認）．それらのうち日本産カニムシ類は，イソ

表 1.　先行研究における DNA 抽出方法および使用部位.
Table 1.　Body parts and methods used for DNA extraction in previous studies.

先行研究	使用部位	方法または使用したキット
Wilcox et al. (1997)	不明	2x CTAB
Zeh et al. (2003)	不明	2x CTAB
Moulds et al. (2007)	不明	Puregene DNA Purification Kit (Qiagen)
Murienne et al. (2008)	全体/付属肢 1 本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Pfeiler et al. (2009)	不明	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Ovchinnikov & Masta (2012)	歩脚 1 本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Zeh et al. (2012)	不明	gDNA Micro Tissue Kit (Life Technologies)
Harrison et al. (2014)	歩脚 2 本	Puregene DNA Purification Kit (Qiagen)
Harvey et al. (2016)	触肢 1 本	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Ohira et al. (2016)	触肢 1 本	本方法

カニムシ *Garypus japonicus* Beier 1952，イソカニムシ属の一種 *Garypus* sp.，イトウカブトツチカニムシ *Mundochthonius itohi* Sakayori 2009，*Mundochthonius* 属の一種 *Mundochthonius* sp. のミトコンドリア DNA COI 領域の部分配列について，計 4 種 69 件が登録されているのみである（Niikura 2014, unpublished; Ohira et al. 2016）．カニムシ目の DNA 解析に関する研究は始まったばかりであり，カニムシ目の分類体系の見直しや多様性の解明のために，より多くの種や個体に基づいた網羅的な解析が必要である．

現代の分類学的研究においては，DNA 解析，形態情報の取得，証拠標本の保持は極めて重要である（Pleijel et al. 2008）．かつては少量の体組織からの DNA 抽出は困難であったため，小型節足動物においては虫体の大部分が DNA 抽出に使用され，形態情報の損失や証拠標本自体が失われる場合が多かった．近年では体内組織の溶出によって DNA を抽出し，外骨格は残す非破壊的な DNA 抽出方法が考案され（例えば，Porco et al. 2010; Aoyama et al. 2015），この問題は解決されつつある．しかしながら，カニムシ類においては，外部形態だけではなく，生殖器の内部構造の情報も分類学的に重要であることが指摘され始めており（例えば，Dashdamirov 2012），上述したような体内組織の溶出による方法は避けるべきである．また既存の分類体系の見直しや診断形質の評価においては，過去のプレパラート標本との形態形質の比較が必要となるため，新規のプレパラート標本も従来の方法に則って同質のものを作製するべきである．これらのことから，近年のカニムシ類の分子系統解析では，触肢や歩脚等の付属肢を 1–2 本用いて DNA 抽出を行い，過去の標本との比較にほとんど影響を与えない方法が採用されている（Murienne et al. 2008; Ovchinnikov & Masta 2012; Harrison et al. 2014; Harvey et al. 2016; Ohira et al. 2016）．

カニムシ類から DNA 抽出を行っている研究の多くは，Qiagen 社の DNA 解析用キット（DNeasy Blood & Tissue Kit や Gentra Puregene DNA Purification Kit，Qiagen）や Life Technologies 社の DNA 解析用キット（ChargeSwitch gDNA Micro Tissue Kit，Life Technologies）を使用している（Wilcox et al. 1997; Zeh et al. 2003, 2012; Moulds et al. 2007; Murienne et al. 2008; Pfeiler et al. 2009; Ovchinnikov & Masta 2012; Harrison et al. 2014; Harvey et al. 2016, 表 1）．これらのキット類を用いた DNA 抽出は，コストや作業量，作業過程における DNA の量的な損失等の点で，充分に最適化されているとは言い難い．例えば，DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen）は多くの研究で使用されている定評のある DNA 抽出キットではあるものの，1 サンプルあたり約 430 円の費用がかかり（2016 年 4 月 8 日現在），多数のサンプルから DNA を抽出する際には不向きである．さらに，サンプルの破砕やその他の作業にかかる時間を除いた溶出のプロセスだけでも少なくとも 1–3 時間程度かかり，サンプルの質によってはオーバーナイトでの溶解が求められる（Murienne et al. 2008; Harvey et al. 2016）．

カニムシ類の分類体系の見直しや診断形質の評価においては，DNA 解析を伴うより多くの知見が必要であることから，網羅的な解析の過程で膨大なサンプルの処理が要求され得る．これに際して，上述のように体内組織の溶出による方法が適さないカニムシ類において，付属肢等の少量の組織片を使用した安価で迅速な DNA 抽出方法は非常に有用性が高い．そこで我々は，カニムシ類の DNA 抽出プロセスにおいて，1）付属肢 1 本のみを使用すること，2）安価であること，3）迅速であること，を満たす方法を新たに開発した．本方法は既に Ohira et al.（2016）が *Mundochthonius* 属のカニムシ類に対して採用しているものの，Ohira et al.（2016）ではその手法について必要最低限の記述がなされているのみであり，作業上のポイントや本手法の利点などには触れられていない．そこで本研究では，異なる亜目に属する小型種を対象に，動物の標準的な DNA バーコーディング対象領域であるミトコンドリア DNA の COI 領域の DNA 解析を実施し，作業上のポイントや本方法の利点について解説および考察した．

材料・方法

解析に使用したカニムシ類

カニムシ類は大きく 2 亜目に分類される（Harvey 1992,

2013)．本研究ではそれぞれ異なる亜目に属する，ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus* Chamberlin 1929（ツチカニムシ亜目：ツチカニムシ科）およびチビコケカニムシ *Microbisium pygmaeum*（Ellingsen 1907）（カニムシ亜目：コケカニムシ科）の成体を解析に用いた．前者は体長 0.8–1.2 mm，後者は体長 1.2–1.5 mm の小型種である（佐藤・坂寄 2015）．ニホンカブトツチカニムシは 2012 年 5 月 23 日に福島県西白河郡西郷村で採集した 3 個体，チビコケカニムシは 2012 年 7 月 1 日に福島県耶麻郡北塩原村で採集した 5 個体を解析に使用した．土壌性カニムシ類である両種は，森林土壌中から「ふるい」を用いたシフティング法とツルグレン装置を用いた抽出法を併用して採集し，純エタノールで固定したのち，4°C で保存した．

DNA 解析は，各個体の触肢の一方をサンプルとして使用した．実体顕微鏡下で微針を用いて，触肢を腿節と転節の間で切断した（図 1）．微針は，タングステン・ニードルを使用するか（作製方法は，日本土壌動物学会編（2007）に詳しい），もしくは医療用の鍼（径＝0.20 mm，長さ＝39 mm，NEO ディスポ鍼，山正）を代用しても良い．切断した触肢は DNA 解析用の試料として純エタノールに入れて 4°C で保存した．触肢以外の部位は触肢と同様の方法で保存，または必要に応じてプレパラート標本を作製し，種の同定に使用した．なお，本研究で使用した全ての標本は，福島大学で保管している．

DNA 抽出

本方法は，少量のサンプルによる DNA 解析を可能とするために，Montero-Pau et al.（2008）および Suyama（2011）の方法を応用した．これらの方法は，動物プランクトンの卵や花粉一粒からの DNA 解析を可能としたものである．これらの方法の特徴は，DNA の抽出溶液をそのまま PCR 増幅の鋳型 DNA 溶液として使用するため，DNA の損失を全くなくすことができる点にある．DNA 吸着カラムやエタノール沈殿等を用いる DNA 抽出方法では，吸着や沈殿の過程で DNA の損失が生じるため，これを完全に回収することができない．そのため，DNA 吸着カラムやエタノール沈殿等を用いる DNA 抽出方法は，DNA 分子の数が限られる花粉一粒やごく微量なサンプルからの DNA 抽出には適さない．しかしながら，Suyama（2011）の方法であれば，細胞数がごく少ないサンプル（1 個以上あれば良い）から抽出した DNA でも PCR 増幅が可能であり，マルチプレックス PCR を行えば，マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型決定も可能である（例えば，Matsuki et al. 2008）．したがって，カニムシ類の触肢のように多数の細胞から構成されている部位であれば，DNA 抽出溶液を希釈し，分注しても PCR 増幅に必要な DNA 量を得ることが期待できる．

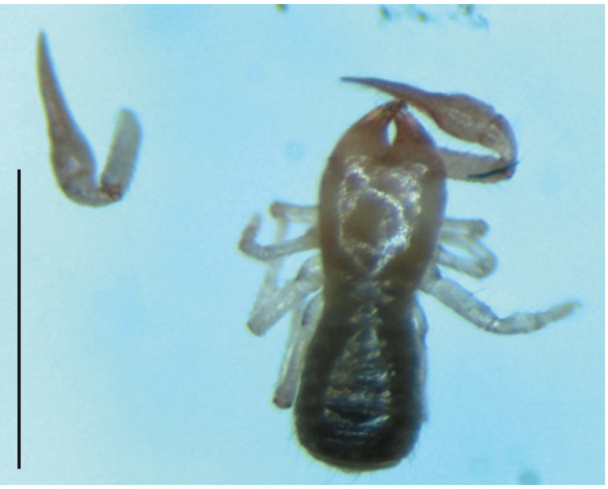

図 1. ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus* Chamberlin，左上は虫体から分離した触肢．スケールは 1 mm.

Fig. 1. *Mundochthonius japonicus* Chamberlin, pedipalp separated from the body in the upper left. Scale＝1 mm.

抽出溶液は Suyama（2011）を参考にし，0.01 M Tris-HCl（pH 8.0），0.01 M EDTA（pH 8.0），0.01% SDS（ニッポンジーン），0.1 g/l Proteinase K（TaKaRa）に調整した．また触肢の破砕には，Montero-Pau et al.（2008）の方法を応用し，マイクロピペットチップを使用した．Montero-Pau et al.（2008）はチップをそのまま使用しているが，本研究の破砕用チップは，アイビスピペットチップ I-503Y（図 2A）を加工したものを用いた．まず 0.2 ml チューブに滅菌済みのチップを差し込み，チューブ底部でチップ先端を押し曲げた．その後，チップ先端をチューブ底部に押し付けながら回転させることで，チップ先端を丸く変形させた（図 2C）．

切断した触肢を，マイクロピペットを用いて純エタノールの保存溶液とともに吸い込み，滅菌済みの PCR チューブに移した．触肢を PCR チューブに移した後，マイクロピペットを用いて余分なエタノールを取り除いた．その後，PCR チューブのふたを開け，サーマルサイクラーを用いてエタノールを完全に乾燥させた（55°C 10 分）．触肢が入っているチューブに抽出溶液を 1.0 μl 添加した後，触肢を抽出溶液と混合させながらチューブ底面へ移動させ，破砕用チップとチューブ底面との間で触肢を潰すようにして，いくつかの破片になるまで破砕した．抽出溶液を 2.0 μl 追加し，56°C 60 分で反応させた後，95°C 10 分で Proteinase K を失活させた．抽出溶液のうち 1.0 μl を TE バッファーで 10 倍に希釈し，PCR 反応に使用した．抽出溶液ならびに希釈した抽出溶液の残りは－30°C で保存した．

PCR による DNA 増幅と塩基配列の決定

上記の方法で得られた抽出物を鋳型とし，動物の標準的

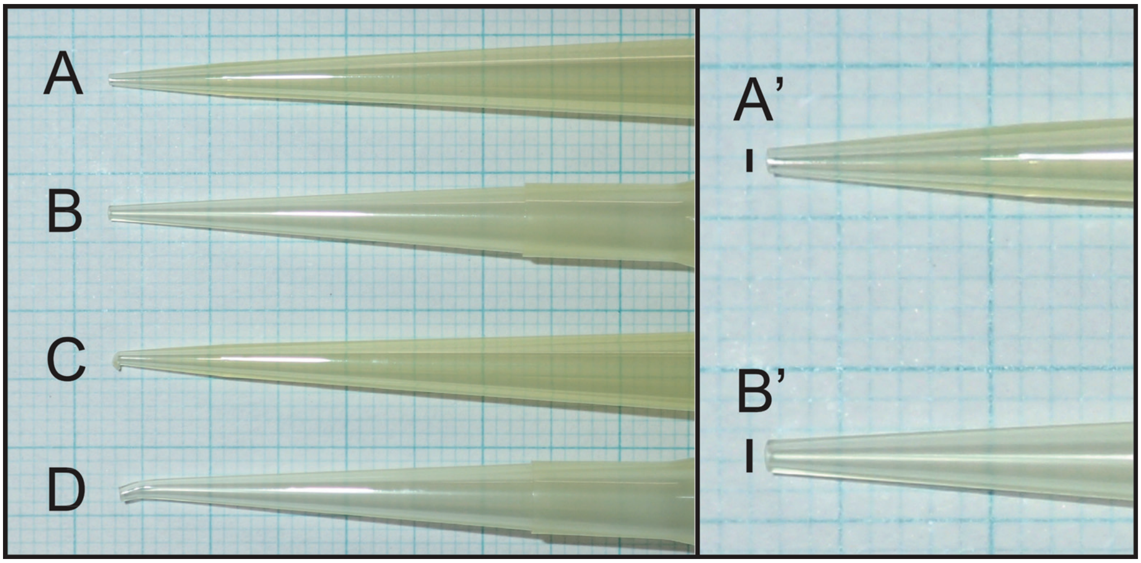

図 2.　破砕用マイクロピペットチップ，背景は 1 mm 方眼紙．A，加工前のアイビス・ピペットチップ I-503Y（A’は A 先端部の拡大図）；B，加工前の他のピペットチップ（B’は B 先端部の拡大図）；C，加工後のアイビス・ピペットチップ I-503Y（先端が丸い破砕に適した形状に加工できた）；D，加工後の他のピペットチップ（先が折れ曲がった，破砕に不適な形状になりやすい）．A’と B’における縦の黒色バーは各マイクロピペットチップの外径を示す．アイビス・ピペットチップ I-503Y はテーパー型となっており，外径は B よりも狭い．

Fig. 2.　Micropipette tips used for homogenization; the background is a graph paper with a 1 mm scale. A, normal Ibis micropipette tip I-503Y (A’, magnified view of the tip of A); B, another normal micropipette tip (B’, magnified view of the tip of B); C, Ibis micropipette tip I-503Y with curved tip, which is suitable for homogenization; D, another micropipette with bent tip, which is not suitable for homogenization. Vertical bars in A’ and B’ indicate the outer diameter of tip of each micropipette tip. The outer diameter of the tip of the Ibis micropipette is more slender than that of micropipette B.

な DNA バーコーディング領域であるミトコンドリア DNA の COI 領域を増幅する，Folmer et al.（1994）のユニバーサル・プライマー（LCO1490; 5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’，HCO2198; 5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’）を用いて PCR 反応を行った．Taq ポリメラーゼは Qiagen Multiplex PCR Kit（Qiagen）を用いた．反応液 8 μl 中に，鋳型 DNA を 0.8 μl，各プライマーを 0.2 μM，Qiagen Multiplex PCR Master Mix（Qiagen）を 4.0 μl 含むように調整した．温度条件は，初期熱変性 95°C 15 分の後，熱変性 94°C 30 秒，アニーリング 51°C 1 分 30 秒，伸長反応 72°C 1 分を 35 サイクル行った後，最終伸長を 60°C 30 分とした．反応終了後，PCR 産物のうち 1.0 μl を 1.5%アガロースゲル（Agarose L03, TaKaRa）を用いて電気泳動し，増幅を確認した．増幅に成功した PCR 産物については，illustra ExoStar（GE Healthcare UK）を用いて酵素処理を行い，ダイレクトシーケンス用の鋳型として精製産物を調整した．精製産物は ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1（Applied Biosystems）でシーケンス反応を行った後，ABI PRISUM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で塩基配列を決定した．

得られた波形データは Finch TV（http://www.geospiza.com/finchtv/）を用いてアセンブルを行い，GenBank から BLAST 検索（NCBI; Altschul et al. 1997）を利用して，近縁種の検索と塩基配列の類似度の確認を行った．

結　　果

抽出方法の工夫

触肢の切断において使用したタングステン・ニードルや医療用の鍼は，DNA 抽出に使用したい付属肢のみを切断することができ，虫体を破損するようなこともなかった．一方，触肢の切断にはピンセットの使用も試みたが，本研究で用いた小型のカニムシ種の場合，特定の付属肢のみを切断することは困難であり，虫体の一部を破損することがあった．

DNA 抽出のために付属肢を破砕するチップは，アイビス・ピペットチップ I-503Y が最も適していた（図 2A，A’）．先端部のみを丸く加工できる点がアイビス・ピペットチップ I-503Y の優れた点である．アイビス・ピペットチップ I-503Y 以外の各種ピペットチップ（図 2B，B’）の使用も試みたが，それらは加工時に折れ曲がることがあり，破砕に適した形状に先端部を加工することが困難であった（図 2D）．また，一般的なクリスタルチップ（より小容量用のチップ，例えば QSP 114 など）の方が先端部は細いが，それらも基部が折れやすく先端部のみを変形させることは難しかった．

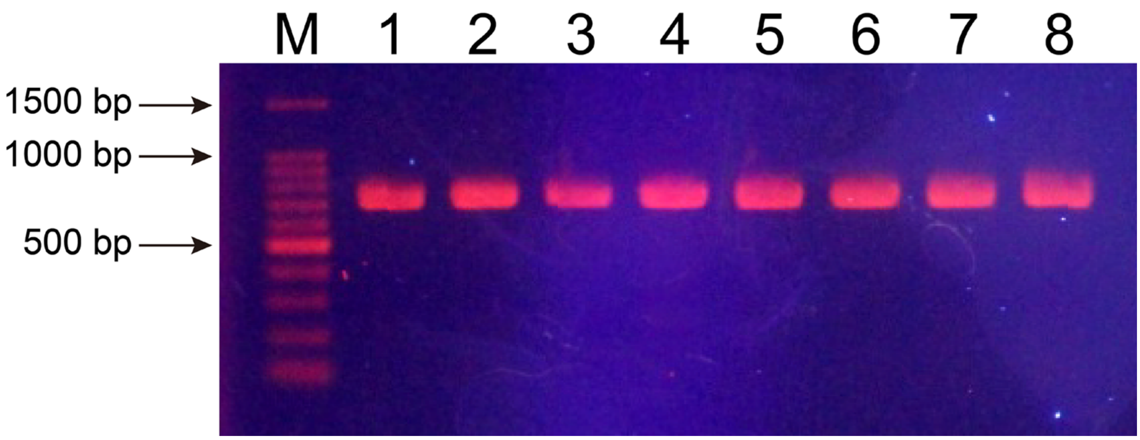

図 3.　片方の触肢から抽出した DNA を鋳型とした PCR 産物の電気泳動像．PCR はプライマーセット LCO1490－HCO2198（Folmer et al. 1994）を用いて行われた．M，サイズマーカー（100 bp ラダー）；1–3，ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus* Chamberlin；4–8，チビコケカニムシ *Microbisium pygmaeum*（Ellingsen）．

Fig. 3.　Agarose gel electrophoresis of PCR products for the COI gene region from DNA extracted using our method; PCR was performed using the primers LCO1490–HCO2198 (Folmer et al. 1994). M, molecular marker; 1–3, *Mundochthonius japonicus* Chamberlin; 4–8, *Microbisium pygmaeum* (Ellingsen). bp＝base pair.

表 2.　PCR 増幅結果および BLAST 検索結果.

Table 2.　Result of PCR amplification and homology search (BLAST) on GenBank.

種	PCR 増幅成功数/解析数	標本 ID	アクセッション番号	最も一致率の高かった配列（BLAST 検索）		
				分類群	アクセッション番号	一致率(%)
ニホンカブトツチカニムシ *Mundochthonius japonicus* Chamberlin［ツチカニムシ亜目］	3 / 3	100 101 102	AB855647	*Tyrannochthonius* sp.	JN018174	80
チビコケカニムシ *Microbisium pygmaeum* (Ellingsen) ［カニムシ亜目］	5 / 5	125 129	AB855648	*Microbisium* sp.	KM835843	89
		126 128	AB855649	*Microbisium* sp.	KM835843	90
		127	LC147076	*Microbisium* sp.	KM835843	89

塩基配列の決定

ニホンカブトツチカニムシ 3 個体およびチビコケカニムシ 5 個体の全個体において，ミトコンドリア DNA の COI 領域における PCR 増幅が認められ（図 3），塩基配列の決定も成功した（表 2）．ニホンカブトツチカニムシについては 616 bp の塩基配列が得られ，3 個体の塩基配列は同一であった．チビコケカニムシについては 563 bp の塩基配列が得られ，5 個体から 3 種類の塩基配列を決定した．それらの塩基配列は，互いに 4–15 塩基座において塩基置換が認められた．

BLAST 検索の結果，ニホンカブトツチカニムシは，同じツチニカムシ科に属する *Tyrannochthonius* sp. の COI 領域における塩基配列と一致率が最も高く，チビコケカニムシは，3 種類の塩基配列とも，同属の *Microbisium* sp. の COI 領域における塩基配列と一致率が最も高かった（2016 年 4 月 18 日確認，表 2）．

以上のことから，本方法によってカニムシ類の DNA を確実に抽出できていることが示された．

考　　察

触肢切断に使用した微針や，DNA 抽出のための触肢破砕に使用したマイクロピペットチップは，いずれも特別なものではない．タングステン・ニードルは，プレパラート標本作製時において，虫体のハンドリングに使用され（日本土壌動物学会編 2007），微小な節足動物類を扱う研究者であれば必携の道具である．また，プレパラート標本を作製しない場合であっても医療用の鍼を代用できる．タングステン・ニードル，医療の鍼のどちらも，様々な径や長さのものを用意することができるので，分類群の体サイズに応じて適切なものを選んで使用することが可能である．破砕用のマイクロピペットチップは，テーパー型になっているものが，破砕用チップの加工に最も適することが分かった（図 2A）．また，チップの先端を加工しなかった場合は，うまく破砕することができないばかりではなく，切断した触肢がピペット内に入り込んでしまうことがある．そのため，カニムシ類においては Montero-Pau et al.（2008）のように未加工のチップを破砕に用いることは避けるべきであ

る．

異なる亜目に属するニホンカブトツチカニムシ，チビコケカニムシの両種において，本研究が新たに開発した方法を用いて良好なPCR増幅および塩基配列の取得に成功した（図3，表2）．両種はカニムシ類のなかでも小型であり，付属肢の切断作業や，DNA抽出プロセスにおいて，体サイズが小さいことが作業や結果に悪影響を及ぼすことはないことが示唆される．これらのことから，本方法はカニムシ類一般に広く適用できる可能性が高いと考えられる．また，より体サイズの小さいニホンカブトツチカニムシの若虫（1 mm未満）であっても，本方法によってDNA解析が可能であることを確認している（大平ほか 未発表）．一般にカニムシ類の種分類に用いられている形態形質は，同種であっても成虫と若虫の間で異なることが多い．さらに，若虫における形態的特徴の記載は乏しいため，形態的特徴に基づいて若虫の種を同定することは困難である（Morikawa 1960; 佐藤・坂寄 2015）．しかし，カニムシ類の塩基配列情報が蓄積されれば，若虫であってもDNAバーコーディングによる種の同定が容易となる．既存の方法よりも安価で迅速なDNA解析を可能とする本研究の方法は，こうした問題の解決の糸口となることが期待される．

本方法は，先行研究におけるカニムシ類のDNA抽出に用いられてきた一般的なDNA抽出キットと比較した場合，DNA抽出に使用した試薬については格段に安価である．一般的にDNA解析を行う実験室には常備されているTris-HCl（pH 8.0）とEDTA（pH 8.0）を除けば，今回使用した試薬はSDS（ニッポンジーン，定価5,000円/100 ml）とProteinase K（TaKaRa，定価20,000円/5 ml）のみである．これらの試薬も使用量はごく僅かであり，1サンプルあたりに要する試薬の総費用は約2円である（2016年4月18日現在）．前述したDNeasy Blood & Tissue Kit（1サンプルあたり約430円）と比べると，約1/200の費用となり，比較的安価なGentra Puregene Tissue Kit（1サンプルあたり約120円）と比べても，約1/60の費用でDNA抽出が可能となる．一方で，虫体の一部を使用して安価にDNA抽出を行う方法は，本方法以外にも考案されている．Casquet et al.（2012）は，小型のクモ類のイソウロウグモ属*Argyrodes*の歩脚を用いた安価なDNA抽出方法を考案している．本方法とは使用する試薬やサンプル片を破砕しないこと，溶解プロセスにかかる時間が長い等の点が異なっている．本方法のサンプル溶解に要する時間は1時間であり，数時間以上あるいはオーバーナイトの溶解時間が推奨されているDNA抽出キットやCasquet et al.（2012）の方法に比べて短い．また，サンプルをサーマルサイクラーにセットするだけで良いため，DNA吸着カラムやエタノール沈殿を用いたDNA抽出に必要な遠心等の作業を省略でき，全体としての作業量・作業時間はさらに少なくなる．使用した機器類も，サーマルサイクラー，PCRチューブ，マイクロピペットチップ等であり，特別なものではない．加えて，DNA抽出には使い捨ての消耗品を使用するため，微量サンプルのDNA解析で問題になりやすいコンタミネーションのリスクも最小限に抑えることができる．技術的な面から見ても，特殊な操作や訓練を必要としない．以上のことから，常時DNA解析を行っている実験室であれば，本方法の導入は容易であると考えられる．

カニムシ類の研究を進めているWestern Australian Museum（オーストラリア）では，遺伝情報を含むカニムシ類標本の様々なデータを提供している（http://museum.wa.gov.au/online-collections/）．博物館が所蔵する質と密度の高い標本コレクションを用いたDNA解析は，分類学のみならず，進化学や生態学においても重要な知見を提供する（Cooper 1994）．例えば，容易にDNAバーコーディングが可能となることで，若虫の形態の記載や，より詳細なファウナの解明に繋がる．また本方法は，理論上細胞が1個以上あればDNAの解析が可能であり，標本の損傷を最小限にとどめることができる．本研究における安価，迅速，低リスク，そして軟組織などの内部形態を将来的に検討可能な状態で残すことができるという利点は，博物館のカニムシを含めた小型節足動物類の膨大なコレクションを利用した網羅的なDNA解析を加速させる一助となることが期待される．

謝 辞

本研究は文部科学省特別経費（プロジェクト）：遷移途中にある自然環境を自然遺産として良好に保全するための研究モデルの策定―磐梯朝日国立公園の人間と自然環境系（生物多様性の保全）に関する研究―（略称：磐梯朝日遷移プロジェクト）の一環として実施された．また，本研究の一部は，株式会社ニチレイによる研究助成を受けて実施された．

引用文献

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389–3402.

Aoyama, H., Saitoh, S., Fujii, S., Nagahama, H., Shinzato, N., Kaneko, N. & Nakamori, T. 2015. A rapid method of non-destructive DNA extraction from individual springtails (Collembola). Appl. Entomol. Zool., 50: 419–425.

Casquet, J., Thebaud, C. & Gillespie, R. G. 2012. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. Mol. Ecol. Resour., 12: 136–141.

Chamberlin, J. 1929. On some false scorpions of the suborder Heterosphyronida (Arachnida–Chelonethida). Can. Entomol., 61: 152–155.

Cooper, A. 1994. DNA from museum specimens. Pp. 149–165. In: Herrmann, B. & Hummel, S. (eds.) Ancient DNA. Springer, New York, 263 pp.

Dashdamirov, S. 2012. A new genus and species of false scorpion from Northern Vietnam (Arachnida, Chelonethi, Neobisiidae). Trop. Nat. Hist., 12: 97–115.

Ellingsen, E. 1907. On some pseudoscorpions from Japan collected by Hans Sauter. Nytt Magasin for Naturvidenskapene, 45: 1–17.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotech, 3: 294–299.

Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S. & Austin, A. D. 2014. Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. Inver. Syst., 28: 386–400.

Harvey, M. S. 1990. Catalogue of the Pseudoscorpionida. Manchester Univ. Press, Manchester, 726 pp.

Harvey, M. S. 1992. The phylogeny and classification of the Pseudoscorpionida (Chelicerata: Arachnida). Inver. Syst., 6: 1373–1435.

Harvey, M. S. 2013. Order Pseudoscorpiones. Pp. 34–35. In: Zhang, Z.-Q. (ed.) Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (addenda 2013). Zootaxa, 3703: 1–82.

Harvey, M. S., Huey, J. A., Hillyer, M. J., McIntyre, E. & Giribet, G. 2016. The first troglobitic species of Gymnobisiidae (Pseudoscorpiones: Neobisioidea), from Table Mountain (Western Cape Province, South Africa) and its phylogenetic position. Inver. Syst., 30: 75–85.

Matsuki, Y., Tateno, R., Shibata, M. & Isagi, Y. 2008. Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. Am. J. Bot., 95: 925–930.

Montero-Pau, J., Gómez, A. & Muñoz, J. 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. Limnol. Oceanogr.-Meth., 6: 218–222.

Morikawa, K. 1960. Systematic studies of Japanese pseudoscorpion. Mem. Ehime Univ. Nat. Sci. Ser. B, 4: 85–172.

Moulds, T. A., Murphy, N., Adams, M., Reardon, T., Harvey, M. S., Jennings, J. & Austin, A. D. 2007. Phylogeography of cave pseudoscorpions in southern Australia. J. Biogeogr., 34: 951–962.

Murienne, J., Harvey, M. S. & Giribet, G. 2008. First molecular phylogeny of the major clades of Pseudoscorpiones (Arthropoda: Chelicerata). Mol. Phylogenet. Evol., 49: 170–184.

日本土壌動物学会（編）2007．土壌動物学への招待—採集からデータ解析まで—．東海大学出版会（秦野），261 pp.

Ohira, H., Kaneko, S. & Tsutsumi, T. 2016. Is abdominal tergal chaetotaxy reliable for species diagnosis of Japanese soil-dwelling *Mundochthonius* pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) ? Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn., 50: 11–13.

Ovchinnikov, S. & Masta, S. E. 2012. Pseudoscorpion mitochondria show rearranged genes and genome-wide reductions of RNA gene sizes and inferred structures, yet typical nucleotide composition bias. BMC Evol. Biol., 12: 31.

Pfeiler, E., Bitler, B. G., Castrezana, S., Matzkin, L. M. & Markow, T. A. 2009. Genetic diversification and demographic history of the cactophilic pseudoscorpion *Dinocheirus arizonensis* from the Sonoran Desert. Mol. Phylogenet. Evol., 52: 133–141.

Pleijel, F., Jondelius, U., Norlinder, E., Nygren, A., Oxelman, B., Schander, C., Sundberg, P. & Thollesson, M. 2008. Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. Mol. Phylogenet. Evol., 48: 369–371.

Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L. & Hebert, P. 2010. Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola. Mol. Ecol. Res., 10: 942–945.

佐藤英文・坂寄廣 2015．クモガタ綱 Arachnida・カニムシ目 Pseudoscorpiones．Pp. 105–118. In: 青木淳一（編著），日本産土壌動物—分類のための図解検索—（第二版）．東海大学出版会（東京），1984 pp.

Suyama, Y. 2011. Procedure for single-pollen genotyping. Pp. 7–15. In: Isagi, Y. & Suyama, Y. (eds.) Single-Pollen Genotyping. Springer, Tokyo, 127 pp.

Weygoldt, P. 1969. Biology of Pseudoscorpions. Harvard University Press, Cambridge, MA, 145 pp.

Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A. & Zeh, D. W. 1997. Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. Mol. Phylogenet. Evol., 7: 208–216.

Zeh, J. A., Bonilla, M. M., Su, E. J., Padua, M. V., Anderson, R. V., Kaur, D., Yang, D. & Zeh, D. W. 2012. Degrees of disruption: projected temperature increase has catastrophic consequences for reproduction in a tropical ectotherm. Glob. Change Biol., 18: 1833–1842.

Zeh, J. A., Zeh, D. W. & Bonilla, M. M. 2003. Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panamá. Mol. Ecol., 12: 2759–2769.

Received May 9, 2016 / Accepted May 24, 2016